



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

| | | | |
|--|--|---|--|
| (51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, C07K 14/72, C12N 7/02 | | A1 | (11) Numéro de publication internationale: WO 98/46777 (43) Date de publication internationale: 22 octobre 1998 (22.10.98) |
| (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00736 (22) Date de dépôt international: 10 avril 1998 (10.04.98) | | (81) Etats désignés: CA, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). | |
| (30) Données relatives à la priorité: 97/04476 11 avril 1997 (11.04.97) FR | | Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i> | |
| (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). UNIVERSITE DE MONTREAL [CA/CA]; 2900 Edouard-Montpetit, Montreal, Quebec H3T 1J4 (CA). | | | |
| (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BOUVIER, Michel [CA/CA]; 2702 Cte-Sté-Catherine, Montreal, Quebec H3T 1B7 (CA). LOISEL, Thomas [CA/CA]; Appartement 204, 2930 Edouard-Montpetit, Montreal, Quebec H3T 1J7 (CA). MARULLO, Stefano [IT/FR]; 1, place de l'Escadrille Normandie Niemen, F-75013 Paris (FR). BOULANGER, Pierre [FR/FR]; 6, rue Maguelone, F-34000 Montpellier (FR). STROSBERG, Arthur, Donny [BE/FR]; 66, rue de Javel, F-75015 Paris (FR). | | | |
| (74) Mandataires: VIALLE-PRESLES, Marie-José etc.; Cabinet Orès, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR). | | | |
| (54) Title: PREPARING MEMBRANE RECEPTORS FROM EXTRACELLULAR BACILOVIRUSES | | | |
| (54) Titre: PREPARATION DE RECEPTEURS MEMBRANAIRES A PARTIR DE BACULOVIRUS EXTRACELLULAIRES | | | |
| (57) Abstract | | | |
| The invention concerns the production of membrane receptors in an insect baculovirus/cell system; said receptors are obtained from extracellular baculoviruses produced by the infected cells. | | | |
| (57) Abrégé | | | |
| L'invention est relative à la production de récepteurs membranaires dans un système baculovirus/cellule d'insecte; lesdits récepteurs sont obtenus à partir des baculovirus extracellulaires produits par les cellules infectées. | | | |

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | | | |
|----|---------------------------|----|--|----|---------------------------------------|----|-----------------------|
| AL | Albanie | ES | Espagne | LS | Lesotho | SI | Slovénie |
| AM | Arménie | FI | Finlande | LT | Lithuanie | SK | Slovaquie |
| AT | Autriche | FR | France | LU | Luxembourg | SN | Sénégal |
| AU | Australie | GA | Gabon | LV | Lettonie | SZ | Swaziland |
| AZ | Azerbaïdjan | GB | Royaume-Uni | MC | Monaco | TD | Tchad |
| BA | Bosnie-Herzégovine | GE | Géorgie | MD | République de Moldova | TG | Togo |
| BB | Barbade | GH | Ghana | MG | Madagascar | TJ | Tadjikistan |
| BE | Belgique | GN | Guinée | MK | Ex-République yougoslave de Macédoine | TM | Turkménistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Grèce | ML | Mali | TR | Turquie |
| BG | Bulgarie | HU | Hongrie | MN | Mongolie | TT | Trinité-et-Tobago |
| BJ | Bénin | IE | Irlande | MR | Mauritanie | UA | Ukraine |
| BR | Brésil | IL | Israël | MW | Malawi | UG | Ouganda |
| BY | Biélorusse | IS | Islande | MX | Mexique | US | Etats-Unis d'Amérique |
| CA | Canada | IT | Italie | NE | Niger | UZ | Ouzbékistan |
| CF | République centrafricaine | JP | Japon | NL | Pays-Bas | VN | Viet Nam |
| CG | Congo | KE | Kenya | NO | Norvège | YU | Yougoslavie |
| CH | Suisse | KG | Kirghizistan | NZ | Nouvelle-Zélande | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | République populaire démocratique de Corée | PL | Pologne | | |
| CM | Cameroun | KR | République de Corée | PT | Portugal | | |
| CN | Chine | KZ | Kazakhstan | RO | Roumanie | | |
| CU | Cuba | LC | Sainte-Lucie | RU | Fédération de Russie | | |
| CZ | République tchèque | LI | Liechtenstein | SD | Soudan | | |
| DE | Allemagne | LK | Sri Lanka | SE | Suède | | |
| DK | Danemark | LR | Libéria | SG | Singapour | | |
| EE | Estonie | | | | | | |

**PREPARATION DE RECEPTEURS MEMBRANAIRES A PARTIR DE
BACULOVIRUS EXTRACELLULAIRES**

L'invention est relative à la production de récepteurs membranaires dans un système 5 baculovirus/cellules d'insecte.

Dans les dernières années, des systèmes d'expression hétérologues ont souvent été utilisés pour étudier l'expression, ainsi que les caractéristiques pharmacologiques et biochimiques des récepteurs 10 membranaires.

Bien qu'une expression significative puisse être obtenue dans certains systèmes d'expression en cellules de mammifère, des problèmes se sont posés, en particulier dans le cas de certains types de récepteurs 15 tels que les récepteurs couplés aux protéines G.

Les récepteurs couplés aux protéines G appartiennent à la super-famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires. Ils comprennent, par exemple, les récepteurs adrénergiques ou muscariniques, et ont 20 tous la même structure qui est faite d'une chaîne polypeptidique comprenant sept domaines hydrophobes qui traversent la double couche lipidique membranaire.

Lorsque l'on cherche à exprimer ces récepteurs dans des systèmes de cellules de mammifère, on obtient 25 généralement une densité relativement faible de récepteurs exprimés par lesdites cellules, excédant rarement quelques picomoles de récepteur par milligramme de protéine membranaire. Bien que ces niveaux d'expression soient suffisants pour une caractérisation 30 fonctionnelle et pharmacologique, ils limitent clairement le type d'études biochimiques, biophysiques et structurelles qui peuvent être effectuées. A fortiori, ce système d'expression ne peut pas être utilisé pour la production de récepteurs en grande quantité, par exemple 35 pour leur utilisation thérapeutique.

Afin d'augmenter la quantité de récepteurs obtenus, différentes équipes ont cherché à les produire

dans un système baculovirus/cellule d'insecte : dans de nombreux cas, des baculovirus exprimant des récepteurs couplés aux protéines G ont pu produire ces récepteurs recombinants dans des cellules des lignées Sf9 ou Sf21 de 5 *Spodoptera frugiperda*, jusqu'à des niveaux atteignant 30 à 100 picomoles par milligramme de protéine membranaire. Ces systèmes ont permis de faire des progrès significatifs dans l'étude de la palmitoylation des récepteurs et également d'étudier les effets produits par 10 différents agonistes et antagonistes, ou bien de procéder à la reconstitution de récepteurs artificiels.

Cependant, le système baculovirus/cellules d'insecte présente l'inconvénient majeur d'exprimer une importante proportion de récepteurs inactifs. Les 15 récepteurs, qui sont récupérés dans la fraction membranaire des cellules infectées par les baculovirus sont sous forme immature et incomplètement glycosylée. Ceci résulte probablement d'une saturation de la voie normale de maturation post-traductionnelle, qui entraîne 20 la rétention de récepteurs immatures dans les membranes du réticulum endoplasmique ou dans l'appareil de Golgi. Pour obtenir des récepteurs fonctionnels on est dans ce cas obligé d'inclure une étape de purification basée sur 25 l'activité biologique du récepteur, (par exemple, une étape de chromatographie d'affinité).

Il serait donc nécessaire de mettre au point un système permettant de séparer facilement la membrane plasmique comprenant les récepteurs matures, des autres fractions membranaires tel que le réticulum endoplasmique 30 ou les membranes de l'appareil de Golgi, qui comprennent le récepteur immature, biologiquement inactif.

Il a été récemment montré que l'infection de cellules Sf9 par un baculovirus codant pour le gène Gag de HIV1 (Pr55 Gag) entraîne le bourgeonnement de 35 particules portant la protéine Gag (particules Gag) qui sont relarguées dans le milieu extracellulaire. Il a été suggéré que ces particules Gag entraînaient lors de leur

bourgeonnement, la membrane plasmique et les protéines qui lui sont associées.

Les Inventeurs ont formulé l'hypothèse que la co-expression dans un système baculovirus/cellules d'insectes, d'un récepteur couplé aux protéines G et de Pr55 Gag peut favoriser le relargage des particules Gag exprimant uniquement des récepteurs matures correctement insérés dans la membrane plasmique. Pour tester cette hypothèse, les Inventeurs ont infecté des cellules Sf9 avec des baculovirus codant le récepteur adrénnergique humain β 2AR et la protéine Pr55 Gag. De façon surprenante, ils ont alors constaté que le récepteur β 2AR est presque totalement absent des particules Gag, mais est en revanche présent à forte densité dans des particules de baculovirus extracellulaires. En outre, les récepteurs exprimés dans ces baculovirus extracellulaires sont correctement glycosylés et normalement actifs.

La présente invention a concerne l'utilisation de ces baculovirus extracellulaires pour l'obtention de préparations d'un récepteur membranaire.

La présente invention a pour objet un procédé de production d'un récepteur membranaire recombinant dans un système baculovirus/cellule d'insecte, à partir d'une culture de cellules d'insectes infectées par un baculovirus recombinant exprimant le gène codant pour ledit récepteur membranaire, lequel procédé est caractérisé en ce que l'on obtient ledit récepteur membranaire à partir des baculovirus extracellulaires produits par lesdites cellules infectées.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré de la présente invention, ledit récepteur appartient à la super-famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires ; il s'agit par exemple d'un récepteur de la famille des récepteurs couplés aux protéines G.

Des baculovirus recombinants exprimant le gène codant pour le récepteur membranaire que l'on souhaite produire sont obtenus par clonage dudit gène sous

contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié dudit baculovirus, selon des méthodes bien connues en elles-mêmes de l'homme de l'art.

N'importe quel promoteur fort de baculovirus utilisable pour l'expression de gènes hétérologues, tel par exemple que le promoteur de la polyédrine (*polh*) ou celui de la protéine P10, peut être employé pour l'obtention d'un baculovirus recombinant utilisable dans le cadre de la présente invention.

10 Selon un mode de mise en oeuvre préféré du procédé conforme à l'invention, il comprend une étape au cours de laquelle on procède à la récolte des baculovirus extracellulaires produits par lesdites cellules infectées et à leur séparation des fractions cellulaires. La 15 récolte et la séparation des baculovirus extracellulaires peuvent être effectuées par centrifugations successives, par exemple de la manière suivante : on effectue une première centrifugation à environ 500×g, à l'issue de laquelle on récupère le surnageant contenant les 20 baculovirus extracellulaires. Ce surnageant est soumis à une centrifugation à environ 45000×g ; le culot résultant qui contient les baculovirus extracellulaires est remis en suspension, et la suspension est soumise à une centrifugation à environ 500×g ; le surnageant résultant 25 de cette centrifugation est centrifugé à environ 45000×g, et l'on récupère le culot, qui contient les baculovirus extracellulaires. Avantageusement, les baculovirus extracellulaires peuvent également être purifiés par centrifugation sur gradient de saccharose, ou tout autre 30 procédé équivalent.

Selon un autre mode de mise en oeuvre préféré du procédé conforme à l'invention, il comprend une étape au cours de laquelle on procède à la lyse des baculovirus extracellulaires produits par lesdites cellules 35 infectées ; avantageusement, il comprend également une étape au cours de laquelle on procède au fractionnement du lysat obtenu à l'issue de l'étape précédente, et à la

récupération de la fraction comprenant ledit récepteur membranaire.

Les préparations purifiées et les lysats de baculovirus extracellulaires, ainsi que leurs fractions 5 comprenant le récepteur membranaire, susceptibles d'être obtenus par les procédés définis ci-dessus constituent des préparations de récepteur membranaire qui font également partie de l'objet de la présente invention. Ces préparations sont constituées par des récepteurs actifs 10 et totalement matures, contrairement aux préparations de récepteurs membranaires obtenues dans l'art antérieur à partir des membranes plasmiques de cellules infectées, qui comprennent une forte proportion de récepteurs inactifs, et qui ne peuvent être utilisées qu'après une 15 étape supplémentaire de purification sur la base de l'activité des récepteurs concernés, par exemple après chromatographie d'affinité.

Au contraire, les préparations de récepteurs membranaires conformes à l'invention sont caractérisées 20 en ce que, préalablement à toute purification effectuée sur la base de l'activité du récepteur concerné, au moins 90%, et de préférence au moins 95% dudit récepteur est sous forme active.

Des préparations, conformes à l'invention, 25 d'un récepteur membranaire peuvent être utilisées pour préparer ledit récepteur sous forme purifiée, avec un bien meilleur rendement que celui auquel on pouvait parvenir à partir des préparations de récepteurs membranaires obtenues dans l'art antérieur à partir des 30 membranes plasmiques des cellules infectées.

Les préparations de récepteurs membranaires conformes à l'invention, ainsi que les baculovirus extracellulaires obtenus lors de la mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention, peuvent également être 35 utilisés directement, par exemple comme système d'étude des propriétés de récepteurs membranaires, comme système de criblage de molécules actives sur ces récepteurs

membranaires, ou bien pour étudier leurs modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation ou la palmitoylation.

La présente invention sera mieux comprise à 5 l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention pour la préparation de récepteurs membranaires.

**EXEMPLE 1 : PREPARATION DE BACULOVIRUS
10 RECOMBINANTS EXPRIMANT UN RECEPTEUR COUPLE AUX
PROTEINES G**

Un baculovirus recombinant exprimant β 2AR est obtenu en clonant une séquence d'ADN constituée par l'ADNc de β 2AR en fusion avec l'épitope *c-myc*, obtenue 15 comme décrit par MOUILLAC et al. [J. Biol. Chem., 267, 21733-21737 (1992)], au site NheI du vecteur de transfection/recombinaison pJVNheI (commercialisé par la société INVITROGEN). Ce vecteur a été transfété avec le 20 génome linéarisé d'un baculovirus AcMNPV (commercialisé par la société INVITROGEN) dans des cellules Sf9 ; le baculovirus recombinant obtenu de la sorte est dénommé *c-myc*- β 2AR.

De la même manière, on a cloné la séquence codant pour le récepteur muscarinique M1 et la séquence 25 codant pour le récepteur dopaminergique D1 [respectivement décrites par ALLARD et al. Nucleic Acid Research, 15, p 10604, (1987) et par DEARRY et al., Nature, 347, p 72, (1990)] pour obtenir les baculovirus recombinants (respectivement dénommés M1-R et D1-R) 30 exprimant ces récepteurs.

a) Culture et infection des cellules, et récolte des baculovirus extracellulaires :

Des cellules Sf9 sont cultivées à 27°C dans des flacons de culture en suspension de 100 ml (BELLCO 35 GLASS) en milieu de GRACE supplémenté (GIBCO) contenant 10% de sérum de veau foetal (FBS), et 0,001% d'acide

pluronique. 60 ml de suspension de cellules (2×10^6 /ml) sont infectées avec le baculovirus recombinant exprimant β 2AR, D1, ou M1, à une multiplicité d'infection variant entre 2 et 5.

5 Les cellules sont récoltées par centrifugation à $500 \times g$ pendant 5 min. à 4°C .

Les particules virales sont isolées après récolte des cellules, par centrifugation du surnageant de culture à $45,000 \times g$ pendant 20 min. à 4°C . Les culots 10 obtenus sont resuspendus à 4°C dans un volume de tampon phosphate salin (PBS) égal à $1/10^{\text{ème}}$ du volume de la culture initiale, et centrifugés à $500 \times g$, pendant 5 minutes à 4°C ; le surnageant de cette centrifugation à $500 \times g$ est à nouveau centrifugé à $45,000 \times g$ pendant 20 mm 15 à 4°C .

b) Purification des particules de baculovirus sur gradient de saccharose

Le culot de particules virales obtenu à partir de 100 ml de cultures de cellules Sf9 infectées par le 20 baculovirus recombinant exprimant β 2AR, M1, ou D1, est resuspendu dans 1,2 ml de solution TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4), en présence d'inhibiteurs de protéases).

La suspension est déposée au sommet d'un tube 25 contenant un gradient linéaire (25%-56%) de saccharose en solution TE. Les tubes sont centrifugés à $100,000 \times g$ pendant 90 minutes. Le gradient est collecté du sommet au fond du tube, en 20 fractions. La première fraction a un volume de 1,4 ml, et les 19 autres sont de 500 μl .

30 **EXEMPLE 2 : MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE β 2AR DANS LES BACULOVIRUS RECOMBINANTS EXTRACELLULAIRES**

Les cellules Sf9 infectées par le baculovirus recombinant exprimant β 2AR sont mises en culture, et les 35 baculovirus sont récoltés comme décrit à l'exemple 1 a),

24 heures, 48 heures, 72 heures, 96 heures, et 120 heures après l'infection.

L'activité des récepteurs β 2AR est évaluée par des mesures de saturation et de liaison compétitive 5 effectuées comme décrit par BOUVIER et al. [Mol. Pharmacol. 33 :133-139 (1982)] en utilisant du [125 I]-iodocyanopindolol ([125 I]ICYP) comme ligand marqué.

Les culots de particules virales obtenus sont resuspendus à 4°C dans le tampon qui sera utilisé pour la 10 réaction. Des aliquotes de cette suspension de particules virales, correspondant à 0,2 à 1 μ g de protéines sont mélangés avec 5 à 350 pM de radioligand [125 I]ICYP dans un volume final de 500 μ l. La liaison non-spécifique est évaluée en utilisant 10 μ M d'alprénoïd.

15 Dans ces conditions, l'activité β 2AR est détectée dans les surnageants des cultures cellulaires à partir de 48 heures après l'infection, atteint son maximum 72 heures après l'infection, et reste constante jusqu'à 120 heures après l'infection.

20 Ces résultats sont illustrés par la Figure 1.

Cette figure montre également les résultats obtenus, dans les mêmes conditions expérimentales, sur des surnageants de cultures de cellules infectées à la fois avec le baculovirus recombinant c-myc- β 2AR, et un 25 baculovirus recombinant exprimant la protéine Gag de HIV (● = β 2AR ; ▲ = β 2AR + Gag). On constate que contrairement à ce qui était initialement attendu, la présence de la protéine Gag n'augmente pas la quantité de β 2AR dans les surnageants de culture.

30 On constate également que l'activité β 2AR détectée dans les surnageants ne provient pas de la lyse cellulaire, dans la mesure où cette activité apparaît 48 heures après l'infection, c'est à dire à un moment où la majorité des cellules infectées sont encore viables, et 35 n'augmente pas entre 72 et 120 heures après l'infection, malgré la lyse cellulaire importante qui se produit à ce moment là.

La nature des particules du surnageant portant l'activité β 2AR a été vérifiée par microscopie électronique, après marquage de ces particules à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'antigène c-myc, ou d'un 5 anticorps dirigé contre le récepteur β 2AR. Il a ainsi été constaté que les particules reconnues par l'un ou l'autre de ces anticorps sont des bâtonnets de 15 x 100 nm, ce qui correspond à des baculovirus extracellulaires.

Dans le cas de la co-infection avec un 10 baculovirus exprimant la protéine Gag, on observe en outre dans le surnageant la présence de particules présentant la morphologie des particules Gag, et reconnues par un anticorps anti-Gag ; cependant, contrairement aux baculovirus extracellulaires, ces 15 particules Gag ne sont que très faiblement reconnues par les anticorps anti-c-myc et anti- β 2AR.

La présence du récepteur β 2AR a également été vérifiée dans les préparations de baculovirus recombinant c-myc- β 2AR purifiées sur gradient de saccharose, comme 20 décrit à l'exemple 1 b) ci-dessus..

L'activité β 2AR a été déterminée selon le protocole décrit à l'Exemple 2 ci dessus, sur les différentes fractions du gradient.

Parallèlement, la détection des antigènes 25 vp80, gp67, et vp39 du baculovirus AcMNPV, en utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre ces antigènes, a été effectuée sur les mêmes fractions. Les résultats obtenus montrent que l'activité β 2AR co-sédimente avec les particules virales.

30 L'ensemble des résultats obtenus ci-dessus montre que non seulement des molécules du récepteur sont exprimées dans les baculovirus extracellulaires recombinants, mais encore qu'il s'agit de molécules actives.

35 La quantification de l'activité β 2AR dans les préparations de baculovirus extracellulaires recombinants purifiées sur gradient de saccharose permet d'évaluer la

densité du récepteur actif à environ 25 pmol/mg de protéines totales.

**EXEMPLE 3 : COMPARAISON DES FORMES DU RECEPTEUR
β2AR PRESENTES DANS DES PREPARATIONS DE MEMBRANES
5 CELLULAIRES ET DANS LES BACULOVIRUS
EXTRACELLULAIRES**

Des cellules Sf9 infectées avec le baculovirus recombinant c-myc-β2AR sont récoltées 72 heures après l'infection. Les baculovirus extracellulaires c-myc-β2AR 10 sont récoltés à partir du surnageant de culture de ces cellules, et les particules virales sont purifiées comme décrit à l'exemple 1 b).

Les membranes des cellules Sf9 sont préparées comme suit : les cellules sont centrifugées à 500 × g 15 pendant 5 minutes à 4°C, rincées une fois avec du tampon PBS à 4°C, et resuspendues dans du tampon de lyse (20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH7,4 contenant 5 µg/ml leupeptine, 5 µg/ml d'inhibiteur de trypsine et 10 µg/ml de benzamidine) à 4°C. Les cellules sont alors lysées par 20 sonication, les lysats sont centrifugés 5 min à 500 × g à 4°C et les surnageants centrifugés à 45,000 × g pendant 20 mm à 4°C. Les culots sont resuspendus à 4°C dans du tampon de réaction (75 mM Tris-HCl (pH 7,4), 12,5 mM chlorure de magnésium, 2 mM EDTA), en présence d'inhibiteurs de 25 protéases.

6 mg de la préparation de membranes cellulaires, ou bien de la préparation de baculovirus purifiés sont ajoutés à 5 ml de tampon de solubilisation (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 7,4, 0,3% n-30 dodécyl maltoside (BOEHRINGER MANNHEIM) en présence d'inhibiteurs de protéases. La solubilisation est effectuée pendant 90 min à 4°C.

Les récepteurs solubilisés sont purifiés par chromatographie d'affinité comme décrit ci-dessous. La 35 matrice d'affinité ALPRENOLOL-SEPHAROSE est synthétisée selon la méthode de BENOVIC et al. [J. Biol. Chem.,

262 :9026-9032, (1987)]. Cette matrice est utilisée pour purifier le c-myc- β 2AR selon le protocole décrit par MOUILLAC et al. [J. Biol. Chem., 267 :21733-21737, (1992)]. Tous les tampons comprennent du n-dodécyl 5 maltoside (0,05%).

Les préparations obtenues après chromatographie d'affinité sont concentrées en utilisant des cartouches CENTRIPREP et CENTRICON (AMICON) et la quantité de c-myc- β 2AR dans chaque échantillon est 10 déterminée en utilisant du [¹²⁵I]-iodocyanopindolol ([¹²⁵I]ICYP) comme décrit par MOUILLAC et al. [J. Biol. Chem., 267 :21733-21737, (1992)]. Les préparations de particules virales, de membranes, ou de β 2AR purifiée par chromatographie d'affinité sont soumises à une 15 électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE), en conditions non-réductrices, sur des plaques de gel à 10%. Les protéines séparées sur les gels sont transférées sur nitrocellulose et révélées avec un anticorps monoclonal de souris anti-c-rnyc, et un second 20 anticorps anti-souris couplé à la phosphatase alcaline ou à la peroxydase de raifort. Les résultats sont illustrés par la Figure 2.

Le transfert de Western de la préparation de membranes cellulaires (Figure 2, piste 1) montre la 25 présence de plusieurs bandes immunoréactives, entre 40 et 50 kDa.

Le transfert de Western des préparations de β 2AR purifiée par chromatographie d'affinité (Figure 2, piste 2) montre une seule et large bande immunoréactive, 30 entre 46 et 50 kDa, qui représente la forme mature, biologiquement active, du récepteur β 2AR.

Le transfert de Western de la préparation de baculovirus extracellulaires purifiés (Figure 2, piste 3) montre également la présence d'une seule et large bande 35 immunoréactive entre 46 et 50 kDa.

Ces résultats montrent que les molécules de récepteur β 2AR présentes dans les baculovirus

extracellulaires représentent uniquement la forme biologiquement active, contrairement aux molécules de récepteur β 2AR présentes dans les préparations de membranes cellulaires, qui représentent un mélange de 5 formes actives et inactives.

EXEMPLE 4 : PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DE DIFFERENTS RECEPTEURS EXPRIMES DANS LES BACULOVIRUS EXTRACELLULAIRES.

Des préparations de baculovirus extra-cellulaires exprimant les récepteurs β 2AR, M1, ou D1 sont obtenues comme décrit dans l'exemple 1 ci-dessus.

La liaison de chacun des récepteurs au ligand est évaluée comme décrit dans l'exemple 2 ci-dessus.

Les essais de liaison compétitive en présence 15 d'agonistes sont effectuées en utilisant 70 pM de [125 I]ICYP comme radioligand. La concentration du ligand non-marqué varie de 10^{-4} à 10^{-12} M.

Les dosages de saturation des récepteurs M1-muscariniques (M1-R) et D1-dopaminergiques (D1-R) 20 exprimés dans les particules virales sont effectuées en utilisant 1-100 nM [3 H]-pirenzepine (NEN, DUPONT) et 0,02-3 nM [125 I]-R(+)-SCH-23390 (NEN, Dupont) avec 5-10 μ g ou 1-2 μ g de protéines pour M1-R et D1-R respectivement. Pour évaluer la liaison non-spécifique, on ajoute au 25 mélange réactionnel 1 μ M Atropine (RBI) pour M1-R, et 10 μ M haloperidol (RBI) pour D1-R.

Les résultats de ces expérimentations sont illustrés par le tableau I ci-après.

TABLEAU I

| Récepteur | Ligand | Kd pM | BMax pmol/mg de protéine | Ki μM |
|-------------|-------------------------------|-------------|--------------------------------|-------------|
| β 2AR | [¹²⁵ I] ICYP | 49,4 ± 11,5 | | |
| | Epinephrine | | | 8,98 ± 4,02 |
| | Arterenol | | | 3,27 ± 0,38 |
| M1 | [³ H]-Pirenzepine | 1360 ± 670 | 5,56 ± 0,46 | |
| D1 | [¹²⁵ I]-SCH23390 | 118 ± 63 | 5,21 ± 0,84 | |

Ces résultats montrent que différents récepteurs de la famille des récepteurs couplés aux protéines G sont exprimés sous forme active dans des baculovirus extra-cellulaires.

**EXEMPLE 5 : PALMITOYLATION DU RECEPTEUR β 2AR
EXPRIME DANS DES BACULOVIRUS EXTRA-CELLULAIRES.**

Les particules virales exprimant c-myc- β 2AR, sont préparées comme décrit à l'exemple 1 ci-dessus, et le culot resuspendu dans du PBS. 1 mCi de [³H]palmitate dissous dans du diméthyl sulfoxyde est ajouté aux particules virales. La réaction est effectuée pendant des durées déterminées en présence ou bien en absence de 1 μ M (concentration finale) d'isoprotérénol.

Les résultats sont illustrés par la Figure 3 :
Légende de la figure 3 :

- : incorporation en l'absence d'isoprotérénol ;
- : incorporation en présence d'isoprotérénol).

EXEMPLE 6 : COMPARAISON DES FORMES DU RECEPTEUR β 2AR

Les particules virales exprimant c-myc- β 2AR sont préparées comme décrit à l'exemple 1 ci-dessus, et le culot resuspendu dans un tampon (100 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, pH 7,4 et des inhibiteurs de protéases). On mélange 1 volume de baculovirus extracellulaires et 1 volume de mélange de phosphorylation (2,3 μ Ci/ μ l de [γ ³²P]ATP, 10 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, pH 7,4, 25 mM

phosphoénol pyruvate, 0,3 mM GTP, 1 mM ATP, 4 U/ml de pyruvate kinase, et 20 U/ml de myokinase). La réaction est effectuée pendant 25 min. à 30°C. A la fin de la réaction, l'incorporation de ^{32}P est mesurée en l'absence 5 d'activateur (témoin) ou en présence de 1 μM d'isoprotérénol, ou de 100 μM de dibutyryl AMP cyclique, ou de 100 μM de forskoline. Les résultats sont illustrés par la figure 4.

Légende de la figure 4 :

10 En ordonnée : incorporation relative de ^{32}P (unités arbitraires)

En abscisse :

BASAL : témoin

FRSK : incorporation en présence de forskoline

15 cAMP : incorporation en présence de dibutyryl AMP cyclique

ISO : incorporation en présence d'isoprotérénol

EXEMPLE 7 : FONCTIONNALITE DU RECEPTEUR $\beta 2\text{AR}$ EXPRIME DANS DES BACULOVIRUS EXTRA-CELLULAIRES

20 Les particules virales exprimant c-myc- $\beta 2\text{AR}$ sont préparées comme décrit à l'exemple 1 ci-dessus, et le culot resuspendu dans un tampon (75 mM Tris-HCl, 12,5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, pH 7,4 et des inhibiteurs de protéases). 20 μl de suspension de baculovirus 25 extracellulaires sont mélangés à 30 μl de milieu réactionnel contenant de 0,2 mM ATP, 0,090 mM GTP, 0,20 mM cAMP, 0,20 mM isobutylméthylxanthine, 1 μCi [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP, 5 mM phosphoénolpyruvate, 0,3 U de pyruvate kinase, et 2 U de myokinase. Après 30 min. d'incubation à 30 37°C, les réactions sont arrêtées par l'ajout de 1 ml de solution d'arrêt (0,4 mM ATP, 0,3 mM AMP cyclique, et 25000 cpm d'AMP cyclique tritié). L'activité a été déterminée en l'absence d'activateur (témoin) ou en présence de l'un des activateurs suivants : 1 μM 35 d'isoprotérénol, 10 μM NaF, ou de 100 μM de forskoline. Les résultats sont exprimés en picomoles d'AMP cyclique

produit par minute et par milligramme de protéine. Ces résultats sont illustrés par la Figure 5.

Légende de la figure 5 :

En ordonnée : activité adényl-cyclase (en picomoles d'AMP cyclique/min./mg de protéine)

En abscisse :

BASAL : témoin

FRSK : incorporation en présence de forskoline

NaF : incorporation en présence de NaF

ISO : incorporation en présence d'isoprotérénol

Ces résultats montrent que le récepteur $\beta 2AR$ présent dans les baculovirus extra-cellulaires est dans un environnement qui reproduit l'environnement membranaire naturel, et que les préparations de baculovirus extracellulaires peuvent donc être utilisées dans toutes les applications des récepteurs membranaires où une reproduction de cet environnement est souhaitable.

REVENDICATIONS

1) Procédé de production d'un récepteur membranaire recombinant dans un système 5 baculovirus/cellule d'insecte, à partir d'une culture de cellules d'insectes infectées par un baculovirus recombinant exprimant le gène codant pour ledit récepteur membranaire, lequel procédé est caractérisé en ce que 10 l'on obtient ledit récepteur membranaire à partir des baculovirus extracellulaires produits par lesdites cellules infectées.

2) Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que ledit récepteur appartient à la super-famille des récepteurs à sept domaines 15 transmembranaires.

3) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que ledit récepteur appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G.

4) Procédé selon une quelconque des 20 revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape au cours de laquelle on procède à la récolte des baculovirus extracellulaires produits par lesdites cellules infectées, et à leur séparation d'avec les fractions cellulaires.

25 5) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape au cours de laquelle on procède à la lyse des baculovirus extracellulaires produits par lesdites cellules infectées.

30 6) Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il comprend également une étape au cours de laquelle on procède au fractionnement du lysat obtenu à l'issue de l'étape précédente, et à la récupération de la fraction comprenant ledit récepteur 35 membranaire.

7) Préparation de récepteur membranaire, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue

par un procédé selon une quelconque des revendications 4 à 6.

8) Préparation de récepteur membranaire selon la revendication 7, caractérisée en ce que préalablement 5 à toute purification effectuée sur la base de l'activité du récepteur concerné, au moins 90%, et de préférence au moins 95% dudit récepteur est sous forme active.

9) Utilisation d'un baculovirus extracellulaire, obtenu à partir d'une culture de 10 cellules d'insectes infectées par un baculovirus recombinant exprimant le gène codant pour un récepteur membranaire, pour l'obtention de préparations dudit récepteur membranaire.

10) Utilisation d'un baculovirus extracellulaire tel que défini dans la revendication 9, ou d'une préparation de récepteur membranaire telle que définie dans une quelconque des revendications 7 ou 8, pour l'obtention d'un modèle d'étude des propriétés dudit récepteur membranaire.

20 11) Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que ledit baculovirus extracellulaire ou ladite préparation de récepteur membranaire sont utilisés pour le criblage de molécules actives sur ledit récepteur membranaire.

1/5

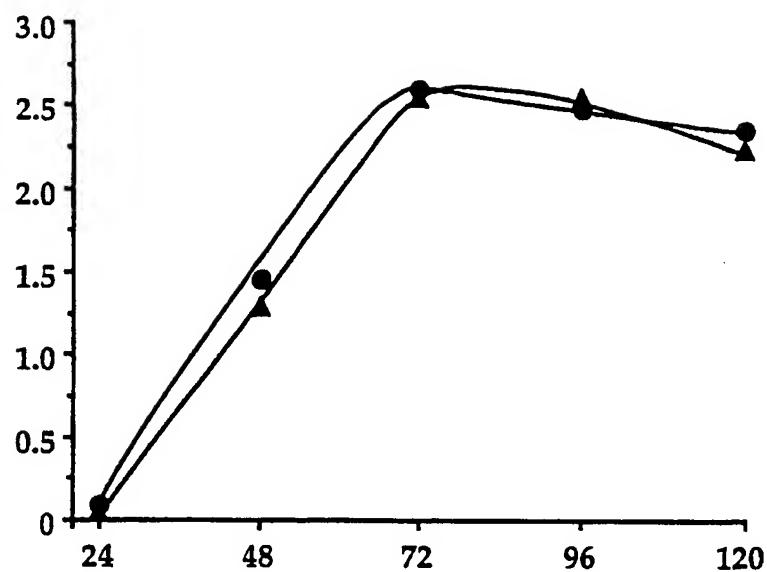


figure 1

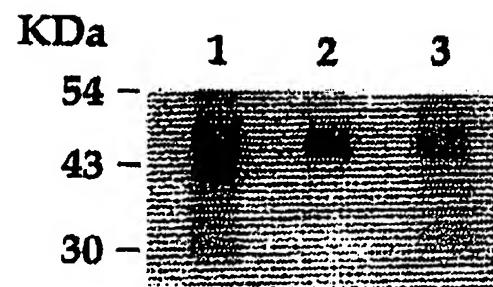


Figure 2

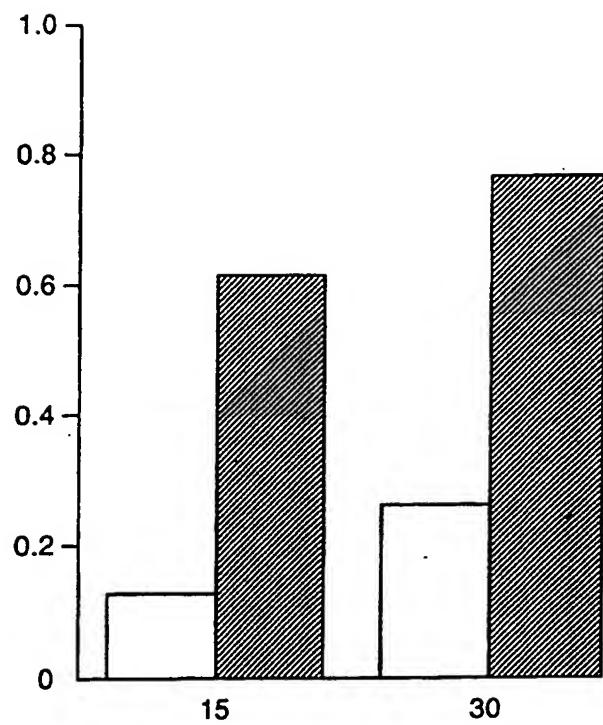


Figure 3

4/5

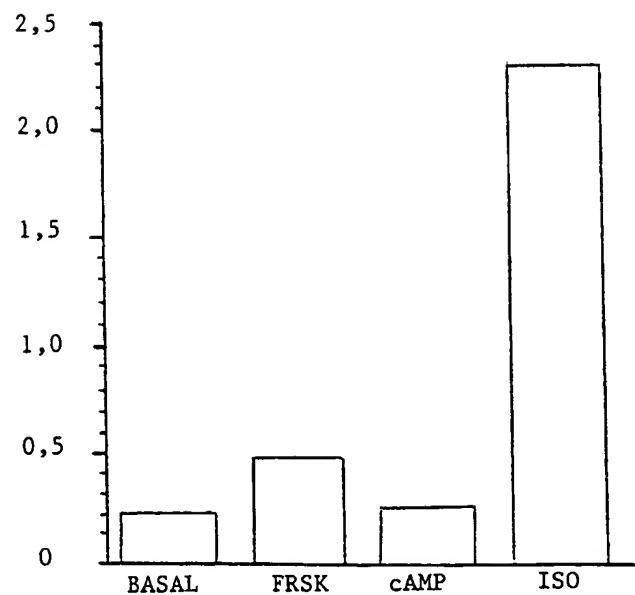


FIGURE 4

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

5/5

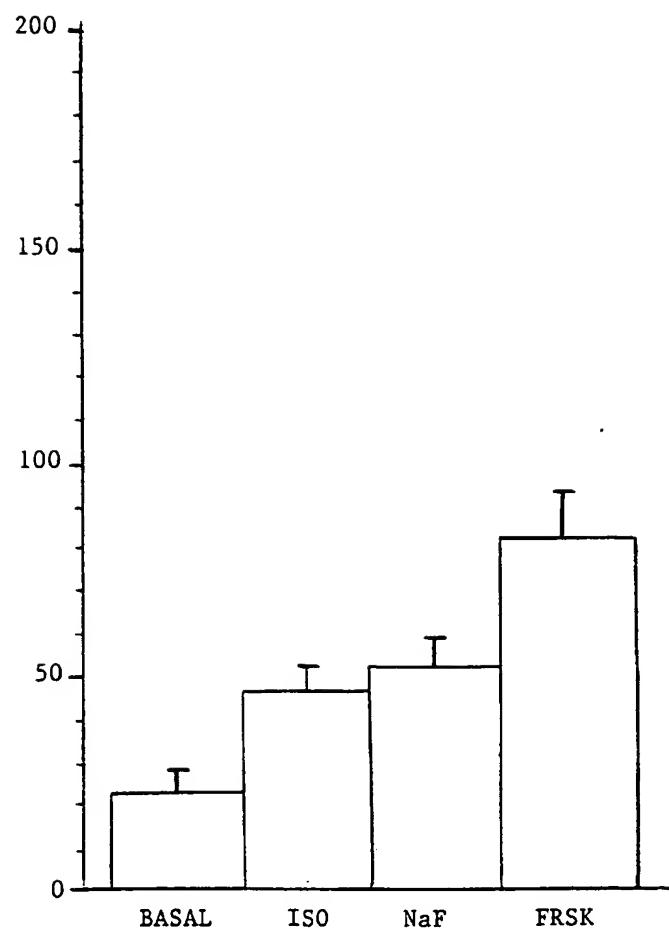


FIGURE 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/00736

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N15/86 C07K14/72 C12N7/02

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|---|-----------------------|
| A | RAIVIO E ET AL: "EXPRESSION OF THE HUMAN INTERLEUKIN-2 RECEPTOR-GAMMA CHAIN IN INSECT CELLS USING A BACULOVIRUS EXPRESSION VECTOR" SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, 1995, 41, 338-342, XP002051485 see the whole document --- | 1,7,9 |
| A | WO 96 38575 A (APPLIED RESEARCH SYSTEMS ;SISK WILLIAM P (US); CHENG SHIRLEY VUI Y) 5 December 1996 see page 13; claim 1 --- | 1,7,9 |
| A | WO 96 09074 A (GEN HOSPITAL CORP) 28 March 1996 see claims 1,10 --- | 1,7,9 |
| | | -/- |

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

| | |
|--|--|
| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
| 31 August 1998 | 07/09/1998 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | Authorized officer Gurdjian, D |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/00736

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| A | WO 88 07082 A (AMERICAN BIOGENETIC SCIENCES) 22 September 1988 see claims 1-8 ---- | 1,7,9 |
| P,X | LOISEL T P ET AL: "Recovery of homogeneous and functional beta-2-adrenergic receptors from extracellular baculovirus particles" NATURE BIOTECHNOLOGY, 15 (12). 1997. 1300-1304., XP002051486 see the whole document ----- | 1-11 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/00736

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|---|------------------|
| WO 9638575 | A 05-12-1996 | AU 6239196 | A | 18-12-1996 |
| | | EP 0832268 | A | 01-04-1998 |
| WO 9609074 | A 28-03-1996 | US 5731182 | A | 24-03-1998 |
| | | AU 3675095 | A | 09-04-1996 |
| | | CA 2200835 | A | 28-03-1996 |
| | | CN 1172435 | A | 04-02-1998 |
| | | EP 0785803 | A | 30-07-1997 |
| | | JP 10506530 | T | 30-06-1998 |
| | | ZA 9507797 | A | 08-07-1996 |
| WO 8807082 | A 22-09-1988 | US 4870023 | A | 26-09-1989 |
| | | AU 1717688 | A | 10-10-1988 |
| | | CA 1325610 | A | 28-12-1993 |
| | | EP 0349594 | A | 10-01-1990 |
| | | JP 2502876 | T | 13-09-1990 |
| | | AU 1542488 | A | 10-10-1988 |
| | | CA 1325611 | A | 28-12-1993 |
| | | EP 0349583 | A | 10-01-1990 |
| | | JP 2502873 | T | 13-09-1990 |
| | | WO 8807087 | A | 22-09-1988 |
| | | US 5041379 | A | 20-08-1991 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De : Internationale No

PCT/FR 98/00736

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/86 C07K14/72 C12N7/02

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C12N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|---|-------------------------------|
| A | RAIVIO E ET AL: "EXPRESSION OF THE HUMAN INTERLEUKIN-2 RECEPTOR-GAMMA CHAIN IN INSECT CELLS USING A BACULOVIRUS EXPRESSION VECTOR" SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, 1995, 41, 338-342, XP002051485 voir le document en entier --- | 1,7,9 |
| A | WO 96 38575 A (APPLIED RESEARCH SYSTEMS ;SISK WILLIAM P (US); CHENG SHIRLEY VUI Y) 5 décembre 1996 voir page 13; revendication 1 --- | 1,7,9 |
| A | WO 96 09074 A (GEN HOSPITAL CORP) 28 mars 1996 voir revendications 1,10 --- | 1,7,9 |

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

31 août 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

07/09/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Gurdjian, D

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

| | |
|-----------------|---------------------|
| Der | é Internationale No |
| PCT/FR 98/00736 | |

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|---|---|-------------------------------|
| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| A | WO 88 07082 A (AMERICAN BIOGENETIC SCIENCES) 22 septembre 1988 voir revendications 1-8 ---- | 1,7,9 |
| P,X | LOISEL T P ET AL: "Recovery of homogeneous and functional beta-2-adrenergic receptors from extracellular baculovirus particles" NATURE BIOTECHNOLOGY, 15 (12). 1997. 1300-1304., XP002051486 voir le document en entier ----- | 1-11 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De. De Internationale No

PCT/FR 98/00736

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | | Date de publication |
|---|------------------------|--|---|--|
| WO 9638575 A | 05-12-1996 | AU EP | 6239196 A 0832268 A | 18-12-1996 01-04-1998 |
| WO 9609074 A | 28-03-1996 | US AU CA CN EP JP ZA | 5731182 A 3675095 A 2200835 A 1172435 A 0785803 A 10506530 T 9507797 A | 24-03-1998 09-04-1996 28-03-1996 04-02-1998 30-07-1997 30-06-1998 08-07-1996 |
| WO 8807082 A | 22-09-1988 | US AU CA EP JP AU CA EP JP WO US | 4870023 A 1717688 A 1325610 A 0349594 A 2502876 T 1542488 A 1325611 A 0349583 A 2502873 T 8807087 A 5041379 A | 26-09-1989 10-10-1988 28-12-1993 10-01-1990 13-09-1990 10-10-1988 28-12-1993 10-01-1990 13-09-1990 22-09-1988 20-08-1991 |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.